



## ARTÍCULO ORIGINAL

## Alteraciones histopatológicas en el hígado del sapo *Peltophryne empusa* (Anura: Bufonidae) del Occidente de Cuba: ¿señal de alarma?

*Histopathological alterations in the liver of the Peltophryne empusa toad (Anura: Bufonidae) from Western Cuba: alarm signal?*

Ana C. Sanz-Ochotorena<sup>1</sup>, Yamilka Rodríguez<sup>1\*</sup>, María de L. Segura-Valdés<sup>2</sup>, Reyna Lara-Martínez<sup>2</sup>, Luis F. Jiménez-García<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Biología Animal y Humana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

\*Autor para correspondencia:

[anita@fbio.uh.cu](mailto:anita@fbio.uh.cu)

### RESUMEN

Durante las últimas dos décadas ha habido una disminución alarmante en las poblaciones de anfibios a nivel global. Entre las causas de este fenómeno se encuentra la contaminación ambiental por factores químicos los cuales pueden tener efectos muy nocivos en hígado y riñones. Los objetivos del presente trabajo fueron describir la histología del hígado de *Peltophryne empusa* y sugerir una posible explicación para la abundante pigmentación detectada en su parénquima. Se recolectaron dos hembras y dos machos en una zona agrícola de la provincia Artemisa, Cuba. Los ejemplares se disectaron; fragmentos de hígado se fijaron en paraformaldehído al 4% y fueron sometidos a la técnica clásica de inclusión en parafina. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina, tricrómica de Mallory y tricrómica de Gomory. Otras porciones de hígado se fijaron en glutaraldehído al 2,5% y se procesaron para microscopía electrónica de transmisión. Los resultados evidenciaron que la histología del hígado era similar a la de otros anfibios; sin embargo, numerosos cuerpos pigmentarios observados fueron centros de melanomacrófagos derivados de células de Kupffer, cuya presencia y abundancia se discute en el presente trabajo.

**Palabras clave:** histología hepática, pigmentos hepáticos, centros de melanomacrófagos, anfibios

### ABSTRACT

Over the past two decades there has been an alarming decline in amphibian populations globally. Among the causes of this phenomenon is environmental pollution by chemical factors which can have very harmful effects on the liver and kidneys. The objectives of the present work was to describe the histology of the *Peltophryne empusa* liver, suggesting a possible explanation for the abundant pigmentation detected in its parenchyma. Two females and two males were collected in an agricultural area of Artemisa province, Cuba. The specimens were dissected; liver

Recibido: 2020-07-16

Aceptado: 2021-02-10

fragments were fixed in 4% paraformaldehyde and were subjected to the classic paraffin embedding technique. The sections were stained with hematoxylin and eosin, Mallory's trichrome and Gomory's trichrome. Other liver portions were fixed in 2.5% glutaraldehyde and processed for transmission electron microscopy. The results showed that the liver histology was similar to that of other amphibians; however, numerous pigment bodies observed were Kupffer cell-derived melanomacrophage centers, the presence and abundance of which is discussed in the present work.

**Keywords:** liver histology, liver pigments, melanomacrophage centers, amphibians

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, muchas poblaciones de anfibios han disminuido drásticamente y algunas especies se han extinguido por los cambios producidos por el hombre en el medio ambiente (Carey y Bryant, 1995; Bishop *et al.*, 2012; Pereda, 2017). El factor más importante que conduce a la disminución de la población de anfibios es la destrucción del hábitat (Pechmann y Wake, 2005; Pounds *et al.*, 2006; Whitaker *et al.*, 2013). Además, los anfibios son más sensibles que otros vertebrados a los contaminantes ambientales por su tegumento desprovisto de queratina y la vulnerabilidad de sus puestas de huevos (Kueneman *et al.*, 2019; Bökony *et al.*, 2020).

Los factores químicos contaminantes (por ejemplo, pesticidas, metales pesados, acidificación y fertilizantes a base de nitrógeno) pueden tener efectos letales, subletales, directos o indirectos en hígado, bazo y riñones (Matavulj *et al.*, 2018; Islam y Malik, 2018). También se ha informado que las células que contienen pigmentos presentes en órganos hematopoyéticos, los denominados melanomacrófagos (MMC), participan en la respuesta inmunológica y en la desintoxicación de contaminantes (Franco-Belussi *et al.*, 2013).

*Peltophryne* es un género de sapos endémico del Caribe que se distribuye desde Cuba hasta las Islas Vírgenes (Schwartz y Henderson, 1991); cuenta con 12 especies, de las cuales ocho son exclusivas del archipiélago cubano (Alonso, 2012). Seis de las ocho especies endémicas de Cuba están en alguna categoría de amenaza, entre las que se encuentra *Peltophryne empusa* como vulnerable aunque tiene una distribución amplia (Amaro, 2012; IUCN 2020). Entre las posibles causas de esta reducción de las especies de anfibios se encuentran la destrucción y fragmentación del hábitat, el calentamiento global (Pounds *et al.*, 2006) y enfermedades infecciosas (Pechman y Wake, 2005; Saucedo *et al.*, 2019; Kueneman *et al.*, 2019)

El hígado de anfibios es un modelo importante para la evaluación de interacciones entre factores ambientales y órganos internos (Barni *et al.* 2002; Fenoglio *et al.* 2005; Rohr *et al.*, 2008). Este órgano es muy importante en la desintoxicación, por lo cual la exposición a contaminantes puede conducir a diversos cambios en su morfología, incluso a nivel celular, que indiquen el grado de contaminación al que han sido expuestos (Păunescu *et al.*, 2010; Ortiz-Ordóñez *et al.*, 2016). Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue describir la histología del hígado de individuos adultos de *Peltophryne empusa* de una localidad agrícola del occidente de Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

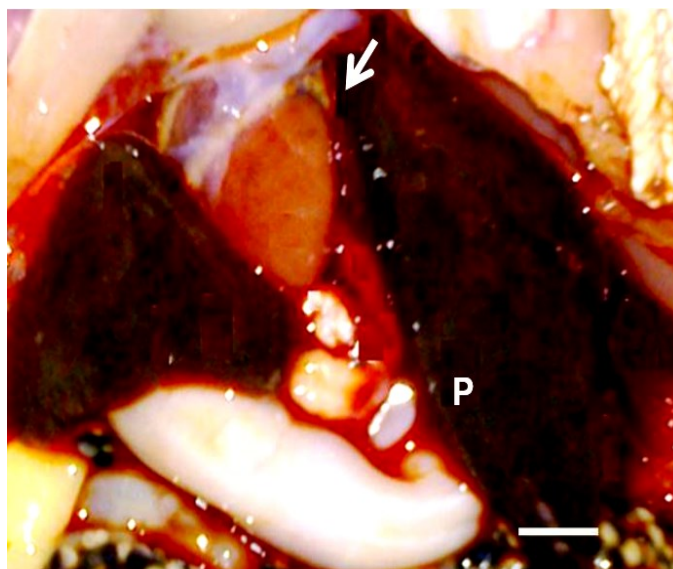
Se trabajó en el mes de junio de 2018, en un área agrícola de La Finca San Paúl, localizada en el municipio San Antonio, provincia Artemisa, Cuba cuyas coordenadas son: 22, 9303<sup>0</sup> Latitud N, 82, 45731<sup>0</sup> Longitud O. En esta área se seleccionaron dos hembras y dos machos de *Peltophryne empusa*. Todos los ejemplares fueron tratados como lo establece el código de ética para manipulación de animales. Los especímenes se anestesiaron en el laboratorio en atmósfera de cloroformo y se realizó la disección bajo un microscopio estereoscópico. Los fragmentos de hígado se fijaron en paraformaldehído al 4% y se procesaron a la técnica clásica de inclusión en parafina (Aguilar *et al.*, 1996). se obtuvieron cortes entre 5 y 7  $\mu$ m con un micrótomos de rotación manual marca Sakura y se colocaron en portaobjetos con albúmina como adherente. Las tinciones histológicas utilizadas fueron hematoxilina y eosina, tricrómica de Mallory y tricrómica de Gomory. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Novel con objetivos de 20X, 40X y 100X; con cámara acoplada digital Nikon E400 para el registro fotográfico. Las imágenes se digitalizaron mediante el programa Image J.

Otras porciones de hígado se procesaron según Vázquez-Nin y Echevarría (2000) y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato a pH 7,4, se lavaron con PBS y posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% por varias horas. Después, las muestras se enjuagaron y deshidrataron en alcoholes de graduación crecientes y se terminó con óxido de propileno. La pre-inclusión se realizó con una mezcla de óxido de propileno y resina epóxica 1:1 por 16 horas. La inclusión se llevó a cabo con resina epóxica durante 16 horas a 60°C y se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos con un micrótopo modelo Ultracut de Leica. Los cortes semifinos para microscopía electrónica

se tiñeron mediante azul de toluidina, mientras que los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes se observaron bajo un Microscopio Electrónico de Trasmisión (MET), JEOL JEM 1010 operado a 80kV.

## RESULTADOS

El hígado de *P. empusa* se ubica posterior y ventral al corazón, tiene dos lóbulos, en los cuales se aprecian pigmentos macroscópicamente (Fig. 1) y está contenido dentro de una cápsula delgada de tejido conectivo fibroso y tejido hematopoyético (Fig. 2A).

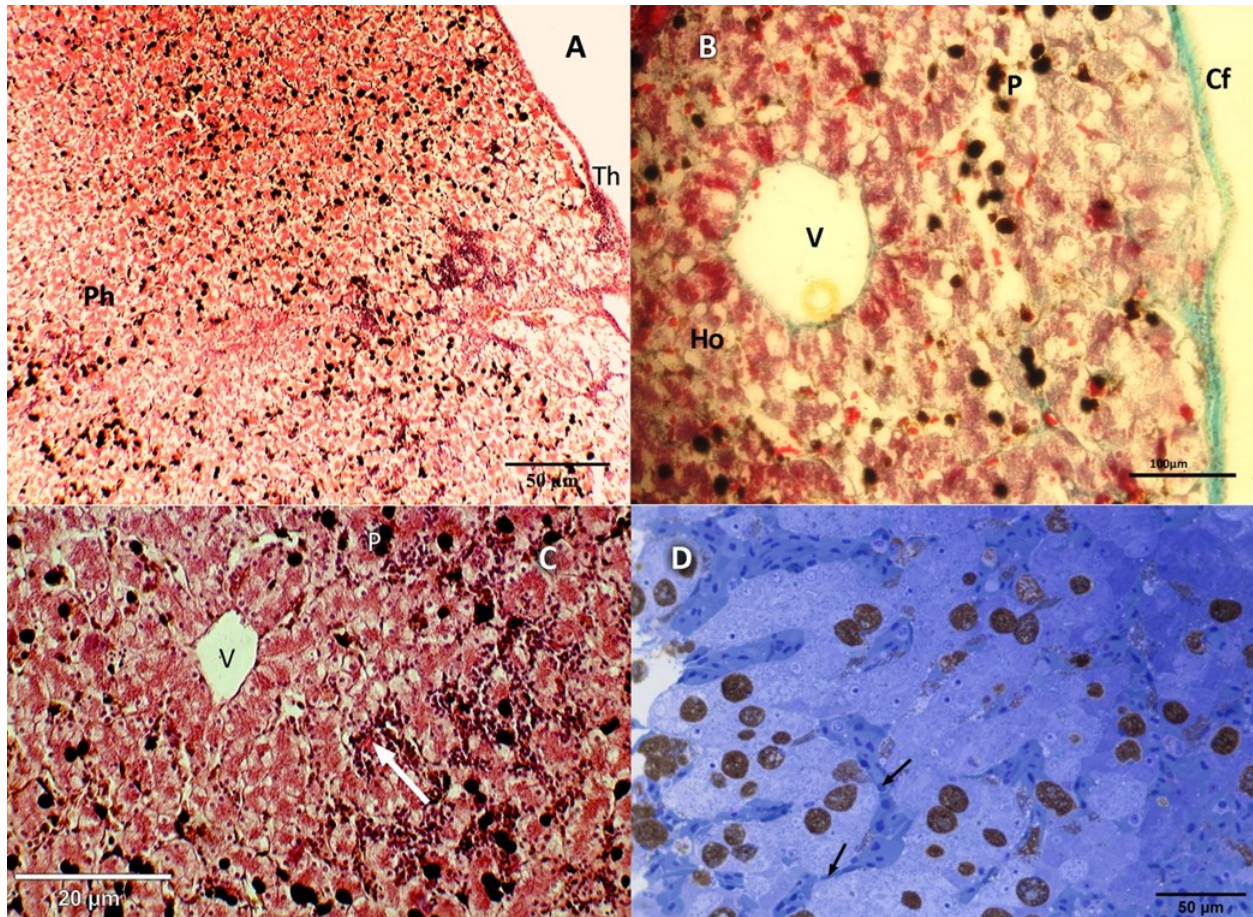


**Figura 1.** Hígado de *Peltophryne empusa* donde se observan los dos lóbulos (flechas) y el pigmento disperso en los lóbulos (P). Barra = 20 mm

**Figure 1.** Liver of *Peltophryne empusa* showing the two lobes (arrows) and the scattered pigment in the lobes (P). Bar = 20 mm.

Histológicamente, el parénquima del hígado (Fig. 2A, Fig. 2B y Fig. 2C) está constituido por hepatocitos, células de origen epitelial poliédricas, dispuestas en hileras orientadas radialmente hacia la vena central, y separadas por sinusoides que son redes capilares. Se observó gran infiltrado inflamatorio (monocitos y linfocitos) relacionados con numerosos pigmentos electrodenso (Fig. 2C). El lumen de los sinusoides contenía eritrocitos (Fig. 2D).

En un corte al microscopio electrónico de transmisión se observan hepatocitos con microvellosidades hacia un canalículo biliar (Fig. 3A). Los canalículos no tienen membrana propia, sino que está formada por la de los hepatocitos. En esa fotomicrografía (Fig. 3A) se detectan numerosas mitocondrias y dos inclusiones de lipofuscina distinguibles en el nivel ultraestructural de otros cuerpos pigmentarios presentes.

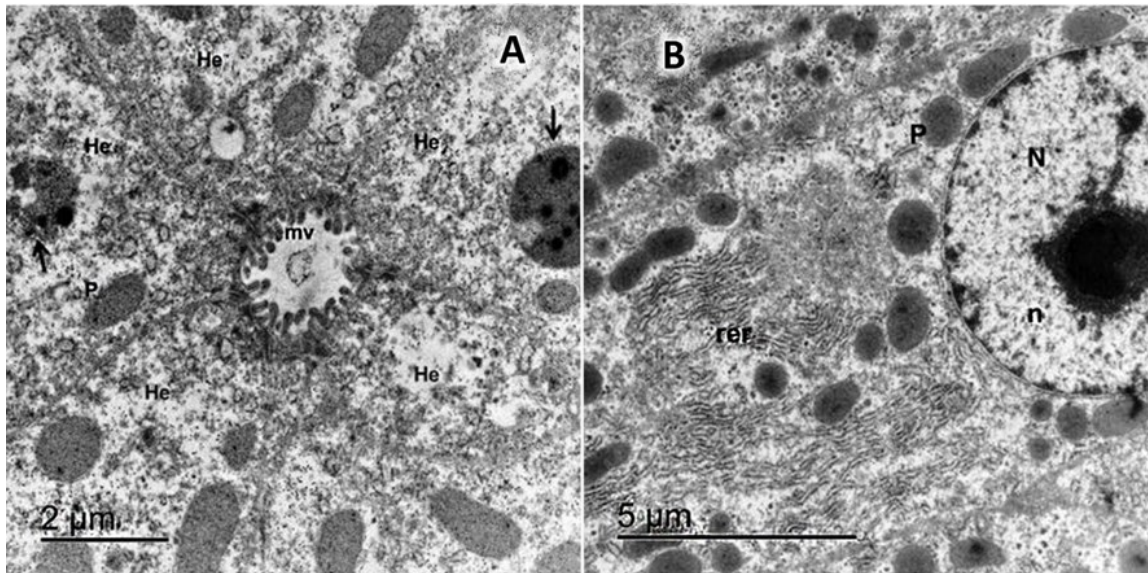


**Figura 2.** **A:** Sección longitudinal del hígado de *Peltophryne empusa* (tinción hematoxilina-eosina). Se observa el parénquima hepático (Ph) con numerosos cuerpos pigmentarios. Nótese el tejido hematopoyético periférico (Th). **B:** Sección transversal del hígado de *Peltophryne empusa* (tinción Gomory) donde se muestran hepatocitos (Ho), la vena central (V), así como la cápsula fibrosa (Cf) de tejido conectivo. P: pigmentos. **C:** Sección transversal del hígado de *Peltophryne empusa* (HE). Se aprecia también la vena y los hepatocitos orientados radialmente hacia esta. Observe el infiltrado de monocitos y linfocitos señalados con flecha. V: vena. P: pigmentos. **D:** Fragmento de tejido hepático de *Peltophryne empusa* en corte semifino teñido con azul de toluidina. Nótese los numerosos centros de melanomacrófagos o cuerpos pigmentarios y los sinusoides con eritrocitos indicados con flechas.

**Figure 2.** **A:** Longitudinal section of the liver of *Peltophryne empusa* (hematoxylin-eosin stain). The liver parenchyma, with numerous pigmentary bodies, is observed. Note the peripheral hematopoietic tissue. Ph: liver parenchyma. Th: hematopoietic tissue. **B:** Cross section of the liver (Gomory stain) showing hepatocytes and the central vein. V: vein. He: hepatocytes. Cf: fibrous connective tissue capsule. P: pigments. **C:** Another cross section of the liver (HE). The vein and hepatocytes oriented radially towards it are also seen. Look at the infiltrated monocytes and lymphocytes marked with an arrow. V: vein. He: hepatocytes. P: pigments. **D:** Fragment of liver tissue in semi-thin section stained with toluidine blue. Note the numerous centers of melanoma macrophages or pigment bodies and sinusoids with erythrocytes indicated by arrows.

En la fotomicrografía (Fig. 3B) donde se muestra un hepatocito al MET, se aprecia el núcleo redondeado y un nucléolo. En el citoplasma se observan varias mitocondrias y fragmentos de retículo endoplasmático rugoso (rer). También se aprecian numerosos cuerpos pigmentarios (Fig. 3B).

Todas las muestras microscópicas estudiadas mostraban las mismas alteraciones hepáticas detectadas relacionadas con la presencia de numerosos cuerpos pigmentarios. No se observaron diferencias a nivel histológico y ultraestructural entre los cortes procedentes de muestras de hembras y machos.



**Figura 3. A:** Corte del parénquima hepático de *Peltophryne empusa* al Microscopio Electrónico de Transmisión. Se muestran cinco hepatocitos hacia un canalículo biliar. He: hepatocitos. mv: microvellosidades. P: pigmentos. Las flechas indican dos inclusiones de lipofuscina. **B:** Un hepatocito de *Peltophryne empusa* al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET). N: núcleo. n: nucléolo. m: mitocondrias. rer: retículo endoplasmático rugoso. P: pigmentos

**Figure 3. A:** Section of the liver parenchyma of *Peltophryne empusa* under the Transmission Electron Microscope (TEM). Five hepatocytes to a bile canalculus are shown. He: hepatocytes. mv: microvilli. P: pigments. Arrows indicate two inclusions of lipofuscin. **B:** A *Peltophryne empusa* hepatocyte under Transmission Electron Microscope. N: core. n: nucleolus. m: mitochondria. rer: rough endoplasmic reticulum. P: pigments

## DISCUSIÓN

La anatomía microscópica encontrada en el hígado de *P. empusa*, tanto en hembras como en machos, es similar en general a la descrita para otras especies de anuros como lo informan Akiyoshi e Inoue (2012) en un estudio sobre la histología de hígado en tres órdenes de anfibios y Akat y Arikan (2017) para el urodelo *Salamandra infraimmaculata*. De igual forma, estos resultados coinciden con lo analizado por Ido-Odokuma y Omokaro (2019) en un estudio comparado en varios vertebrados sobre la anatomía macro y microscópica del hígado.

La ultraestructura hepática descrita en el presente trabajo está acorde a los resultados de las investigaciones de Bernabò *et al.* (2014) en un anfibio urodelo o caudado, el tritón *Lissotriton italicus*. en relación con los hepatocitos, la ultraestructura descrita aquí es similar a lo informado por Prelovšek *et al.* (2008) para otro anfibio caudado.

La gran cantidad de células pigmentarias observadas al microscopio de campo claro y al electrónico en el parénquima hepático de *P. empusa* son melanomacrófagos que se encuentran en el hígado de los

anfibios. Sichel *et al.* (1998) realizaron un análisis de sus orígenes, características y funciones y sugirieron que son derivados de las células de Kupffer. Por el contrario, Zuasti *et al.* (1998) informan para *Xaenopus laevis* que los pigmentos extracutáneos forman un sistema pigmentario de función desconocida. Las investigaciones sobre esta temática se continuaron y existe consenso en declararlas agregados de macrófagos o centros de melanomacrófagos (Guida *et al.*, 1998, Prelovsek y Bulog, 2003; Aziz y Saad, 2006); tal y como parece ocurrir también en *P. empusa*. No obstante, recientemente otros autores analizan su relación con el sistema inmune (Steinel y Bolnick, 2019; Franco Belluci *et al.*, 2020).

Estos centros melanomacrófagos se observan en las figuras 2 y 3 y son capaces tanto de producir nuevos melanosomas (biogénesis), como de fagocitar los viejos (Prelovsek y Bulog, 2003). Según Corsaro *et al.* (2000) su función principal es la fagocitosis de eritrocitos, del hierro y de diversos pigmentos. Los hallazgos sobre la presencia de infiltrados de monocitos y linfocitos se explica en humanos como indicio de una lesión hepática no infecciosa. Los monocitos se infiltran en el tejido hepático y son un

componente crítico de la respuesta inmune innata que puede causar inflamación crónica, fibrosis y hasta carcinoma hepatocelular a largo plazo (Brempeles y Crispi, 2016; Triantafyllou *et al.*, 2018). No se ha encontrado informes de la función de los centros melanomacrófagos en otros vertebrados.

Los centros melanomacrófagos son agrupaciones distintivas de células que contienen pigmentos dentro de los tejidos de los vertebrados heterotérmicos (Agius y Roberts, 2003). Entre la variedad de pigmentos que contienen están las melaninas y la lipofuscina, las cuales aumentan en rango y volumen en el hígado, en presencia de enfermedades o contaminación tanto en peces, como anfibios y reptiles (Agius y Roberts, 2003; Pronina *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014). El incremento en el número y área ocupados por los melanomacrófagos puede relacionarse con su participación en los procesos de detoxificación de agentes oxidantes, y su relación con la inmunidad innata o adaptativa en los heterotérmicos (Fourier, 2004; Steinel y Bolnick, 2019; Franco-Belussi *et al.*, 2020). Las células pigmentarias indican respuestas al deterioro del ambiente y el cambio climático, así que podrían ser consideradas como biomarcadores histológicos de contaminación ambiental (Pronina *et al.*, 2014). Acorde con la afirmación anterior, se han sugerido como biomarcadores confiables en estrés oxidativo (Huespe *et al.*, 2017) o también en anfibios procedentes de ambientes degradados y contaminados (Matavulj *et al.*, 2018).

Los ejemplares objeto del presente estudio se recolectaron en una zona agrícola, un área antropizada con zonas de cultivo de viandas como la yuca, hortalizas como el frijol, y frutales, en la cual se utilizan fertilizantes químicos nitrogenados, frecuentemente fertilizante (NPK) que contiene nitrógeno, fósforo y potasio. Esta pudiera ser la razón del aumento de la pigmentación hallada en el hígado en los ejemplares de sapos analizados en este trabajo.

Se ha informado que los centros de melanomacrófagos en el hígado también incrementan en tamaño y número en condiciones de estrés ambiental (Crawshaw y Weinkle, 2000). También en condiciones de toxicidad química, por ejemplo en presencia de fertilizantes nitrogenados (Densmore y Green, 2007; Bernabò *et al.*, 2014), insecticidas (Păunescu *et al.*, 2010) y cadmio (Medina *et al.*, 2016). Un exceso de fertilización nitrogenada puede tener múltiples repercusiones en el ambiente (Baisre, 2006; Martínez, 2018). Algunas de las más relevantes son la contaminación de acuiferos (Densmore y Green, 2007; Treasure, 2013) que se

utilizan con frecuencia para regar las tierras de cultivo en áreas agrícolas como es la zona donde habitan los sapos investigados.

Los hallazgos a nivel celular y ultraestructural presentados en este trabajo, sobre un órgano esencial en una especie endémica de sapo, alertan de un posible daño hepático que puede estar sucediendo con las poblaciones de este y probablemente otros anfibios cubanos, por lo cual se hace muy necesario profundizar en investigaciones similares. Acorde a los resultados de este trabajo y por su amplia distribución, *Peltophryne empusa* pudiera ser un buen modelo para continuar este tipo de estudios en Cuba.

## LITERATURA CITADA

- Agius C y R. J. Roberts (2003). Melanomacrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26(9). 499–509
- Aguilar, M., B. Coutiño y P. Salinas (1996). Manual de técnicas histológicas e histoquímicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 130 pp.
- Akat E. y H. Arkan (2017) A Histological Study on Liver of Near Eastern Fire Salamander, *Salamandra infraimmaculata* Martens, 1885 (Urodela: Salamandridae). *Acta Zool. Bulg.* 69 (3). 317-321
- Akiyoshi H. y A. M. Inoue (2012). Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers. *Comp. Hepatol.* 11(2): 1-9
- Alonso R., A. J. Crawford y E. Bermingham (2012). Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: *Peltophryne*) based on mitochondrial and nuclear genes. *J. Biogeogr.* 39: 434-451.
- Amaro, S. (2012). Lista Roja de la fauna cubana Editorial AMA. La Habana. 171 pp.
- AmphibiaWeb (2020). University of California, Berkeley, CA, E.E.U.U. Disponible en <<https://amphibiaweb.org>> . Último acceso: 5 de diciembre de 2020
- Aziz A. A. y A. H. Saad (2006). Histological characterization of Kupffer cells in two species of Anuran Amphibia. *Egypt. J. Exp. Zool.* 2: 123-128
- Barni S., R. Vaccarone, V. Bertoni, A. Frascini, *et al.* (2002) Mechanism of change to the liver pigmentary components during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana sculentata* L. *J. Anat.* 200(2): 185-194.
- Baisre, J (2006). Assessment of nitrogen flows into the Cuban landscape. *Biogeochemistry.* 79: 91–108
- Bernabò, I., P. Biasone, R. Macirella, S. Tripepi, *et al.* (2014). Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): Normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66(9-10): 455-468.
- Bishop, P. J., Angulo, A. Lewis, J. P. Moore, *et al.* (2012). The amphibian extinction crisis-what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? *SAPI EN. S. Surveys and Perspectives Integrating Environment and Society*, (5.2).
- Bökony, V. V. Verebelyi, N. Ujhegyi, Z. Mikó, *et al.* (2020). Effects of two little-studied environmental pollutants on development in anurans. *Environ. Pollut.* 260. 114078
- Brempeles K. J. e I. N. Crispe (2016). Infiltrating monocytes in liver injury and repair. *Clin. Transl. Immunology.* 5: 1-9.

- Carey, C. y C.J. Bryant (1995). Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development and decline of amphibian populations. *Environ. Health Perspect.* 103: 13–17.
- Corsaro, C., M. Scalia, N. Leotta, F. Mondio *et al.* (2000). Characterisation of Kupffer cells in some Amphibia. *J. Anat.* 196: 249–261
- Crawshaw G. J. y T. K. Weinkle (2000). Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 9 (3): 165-173.
- Densmore, C y D. E. Green (2007). Diseases of Amphibians. *ILAR Journal* Volume 48, Number 3. 235-254. Disponible en: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article-abstract/48/3/235/663549> . Último acceso: 8 de mayo de 2020.
- Fenoglio C., E. Boncompagni, M. Fasola, C. Gandini, *et al.* (2005) Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana sculentia*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 60(3) 259-268
- Fourier, M (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat. Toxicol.* 67: 33–43
- Franco-Belussi, L., A. M. Castrucci, C. Oliveira (2013). Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- $\alpha$  melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology*. 116: 316–324
- Franco-Belussi, L., D. B. Proverte, R. E. Borges, C. De Oliveira, *et al.* (2020). Idiosyncratic liver pigment alterations of five frog species in response to contrasting land use patterns in the Brazilian Cerrado. *Peer Journal Life & Environment*. 8: 9751
- Guida G., I. Maida, A. Gallone, D. Boffoli *et al.* (1998) Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. *Cell Developmental. Anim. Biol.* 34: 393-400
- Huespe I., M. Cabagna-Zenkhusen, L.M. Marilén Curi, P. Peltzer, *et al.* (2017). Liver melanomacrophages and glutathione S-transferase activity in *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) as biomarkers of oxidative stress due to chlorpyrifos exposition. *Acta Biol. Colomb.* 22 (2): 234-237.
- Ido-Odokuma, E. e I. Omokaro (2019). Comparative histologic anatomy of vertebrate liver. *Ann. Bioanthropol.* 3(1): 1-5.
- Islam, A. y M. F. Malik, (2018). Impact of Pesticides on Amphibians: A Review. *J. Toxicol. Anal.* 1 (2): 3.
- IUCN (2020). IUCN Red list of threatened species. Version 2020.2. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/>. Último acceso: 8 de mayo de 2020
- Kueneman J. G., M. C. Bletz, V. McKenzie, G. Becker, *et al.* (2019). Community richness of amphibian skin bacteria correlates with bioclimate at the global scale. *Nat. Ecol. Evol.* 3 (1): 381–389
- Martínez, R. (2018). Los peligros de los fertilizantes químicos. *BioEco.* 12. 23-32
- Matavulj, M., V. Rajković, A. Vukajlović, I. Gojković (2018). Utility of liver macrophage aggregates as an indicator of frog exposure to degraded environments. A stereological analysis. *Annals Fac. Engi. Hunedoara III*(1): 111-116
- Medina M.F., M.E. González, M.R. Klyver, I.M. Aybar Odstreil (2016) Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cadmium Turkish Journal Biology. 40: 229-238
- Ortiz-Ordóñez, E., E. López-López, J.J. Sedeño-Díaz, E. Uría, *et al.* (2016). Liver histological changes and lipid peroxidation in the amphibian *Ambystoma mexicanum* induced by sediment elutriates from the Lake Xochimilco. *J. Environ. Sci-China*, 46:156-164.
- Păunescu, A., C. M. Ponepal, O. Drăghici, A.G. Marinescu (2010). Liver histopathologic alterations In the frog *Rana ridibunda* (Pelophylax) induce by the action of reldan 40EC insecticide. *An Univ Oradea Fasc. Biol.*, 17(1), 166-169.
- Pechmann J. K. y D. B. Wake (2005). Principles of Conservation Biology, eds Groom M, Meffe GK, Carroll CR (Sinauer, Sunderland, MA), 3rd Ed. 236pp
- Pereda, J. A. (2017). La crisis biológica de los anfibios Ecologistas en Acción de León. *Revista El Ecologista*. 81: 239-256
- Pereira B. F., L. A. Anderson, J. A. Senhorin, R. de Cássia, *et al.* (2014). Effects of Biodegradable detergents in the accumulation of lipofuscin (Age Pigment) in gill and liver of two Neotropical fish species, *Int. J. Morphol.* 32(3): 773-781.
- Prelovšek P-M, L. B. Mali y B. Bulog (2008). Hepatic cells of Proteidae (Amphibia, Urodela): A comparative histochemical and ultrastructural study. *Anim. Biol.* 58: 2-18
- Prelovsek, P.M. y B. Bulog (2003). Biogenesis of melanosomes in Kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela: Amphibia). *Pigment Cell Res.* 16(4): 345-350.
- Pronina, S.V., M.D. Batueva y N.M. Pronin (2014). Characteristics of melanomacrophage centers in the liver and spleen of the roach *Rutilus rutilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Lake Kotokel during the Haff disease outbreak. *J. Ichthyol.* 54 (1): 104–110.
- Rohr J. R., A. M. Schettehoefer, T.R. Raffel, H.J. Carrich, *et al.* (2008) Agrochemicals increase trematode infections in declining amphibian species. *Nature* 455(7217): 1235-1239
- Saucedo B., J.M. Serrano, M. Jacinto-Maldonado, R.S.W. Leuven, *et al.* (2019) Pathogen risk analysis for wild amphibian population following the first report of ranavirus outbreak in farmed American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) from Northern Mexico. *Viruses* 11(26) 1-15
- Sichel, G., Scalia, M., Mondio, F. y Corsaro, C. (1997) The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Res.* 10(5): 271-287.
- Steinel, N., y D. Bolnick (2019). Melanomacrophage Centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Front. Immunol.* 8: 827-840
- Schwartz, A. y R.W. Henderson (1991). Amphibians and reptiles of the West Indies: descriptions, distributions, and natural history. 213pp. University of Florida Press, Gainesville, FL.
- Treasure, A. (2013). Agua y Saneamiento: En: Salud, ambiente y desarrollo sostenible: hacia el futuro que queremos. Serie de seminarios de la OPS hacia Rio+20 Washington, DC: OPS. 123 pp.
- Triantafyllou E., K J. Woollard, M. McPhail, C. Antoniadis, *et al.* (2018). The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure *Front. Immunol.* 9, 2948.
- Vázquez-Nin, G. H. y O. M. Echevarría (2000). Introducción a la Microscopía Aplicada a las Ciencias Biológicas (UNAM, Fondo de Cultura Económica, México, D.F.). 234 pp
- Whitaker K. S., Koo D. B Wake y V. Vance T. (2013). Global Declines of Amphibians. En: Levin S.A. (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*, second edition, Vol. 3, pp. 691-699. Waltham, MA: Academic Press. © 2013 Elsevier Inc.
- Zuasti, A., C. García Borrón y C. Ferreri (1998). The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Arch. Histol. Citol.* 61: 305-316.

